

F I N T COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 August 2000 (01.08.00)	
International application No. PCT/JP99/07106	Applicant's or agent's file reference FP-DC-0041
International filing date (day/month/year) 17 December 1999 (17.12.99)	Priority date (day/month/year) 22 December 1998 (22.12.98)
Applicant MIYAZAKI, Osamu et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 June 2000 (13.06.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FP-DC-0041	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/07106	International filing date (day/month/year) 17 December 1999 (17.12.99)	Priority date (day/month/year) 22 December 1998 (22.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577		
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 June 2000 (13.06.00)	Date of completion of this report 02 March 2001 (02.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/07106

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-13, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 2-8, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1, filed with the letter of 12 September 2000 (12.09.2000)
- ☒ the drawings:
pages 1-8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/07106

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: C. J. Fielding et al., "Molecular physiology of reverse cholesterol transport", J. Lipid Research (1995), Vol. 36, No. 2, pp. 211-228

Document 2: P. E. Fielding et al., "Unique epitope of apolipoprotein A-1 expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalysed efflux of cellular cholesterol", Biochemistry (1994), Vol. 33, No. 22, pp. 6981-6985

Document 3: O. Gursky et al., "Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state", Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1996), Vol. 93, No. 7, pp. 2991-2995

Claims 1-8

Document 1 discloses non-lipid-bound human apolipoprotein A-I in HDL free of human apolipoprotein A-II, and a prebeta-1 HDL human apolipoprotein A-I monoclonal antibody.

Document 2 discloses a monoclonal antibody against murine apolipoprotein A-I, which recognizes prebeta-1 HDL in blood plasma.

Document 3 indicates that denaturation of human

THIS PAGE BLANK (USPTO)

apolipoprotein A-I is temperature-dependent, and describes alterations in tertiary structure at 5°C, 25°C and 40°C (see Fig. 3).

Creating a hybridoma in order to produce monoclonal antibodies, use of a monoclonal antibody to detect an antigen, and RIA and EIA as means of immunoassay were commonly known techniques before the priority date of the present application.

It is also commonly known that HDL is lipoprotein including phospholipid, cholesterol, protein and triglyceride, and that human plasma contains HDL of various molecular weights, differing in the constituents therein, such as cholesterol, and the ratios thereof. It is therefore recognized that human plasma could contain HDL of a molecular weight of 150,000 or less which is free of apoA-II.

A person skilled in the art could easily conceive of selecting HDL of a molecular weight of 150,000 or less which is free of apo A-II from non-lipid-bound HDL free of apoA-II without restriction of molecular weight in an invention disclosed in Document 1 or 2, and create monoclonal antibodies against this HDL of a molecular weight or 150,000 or less.

A person skilled in the art could also easily conceive of a monoclonal antibody against human or murine apolipoprotein A-I disclosed in Document 1 or 2 as a monoclonal antibody that can detect changes in tertiary structure in "temperature-dependent denaturation of human apolipoprotein A-I" as disclosed in Document 3, and use RIA or EIA for immunologically detecting said monoclonal antibody, applying the known techniques mentioned above.

Moreover, the invention does not appear to offer any surprising advantageous effect by selecting HDL with a



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/07106

molecular weight of 150,000 or less.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ARUGA, Mitsuyuki
Kyodo Bldg.
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0013
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 09 February 2000 (09.02.00)	
Applicant's or agent's file reference FP-DC-0041	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/07106	International filing date (day/month/year) 17 December 1999 (17.12.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 22 December 1998 (22.12.98)
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
22 Dec 1998 (22.12.98)	10/364295	JP	04 Febr 2000 (04.02.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Marc Salzman

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ARUGA, Mitsuyuki
Kyodo Bldg.
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0013
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

29 June 2000 (29.06.00)

Applicant's or agent's file reference

FP-DC-0041

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/JP99/07106

International filing date (day/month/year)

17 December 1999 (17.12.99)

Priority date (day/month/year)

22 December 1998 (22.12.98)

Applicant

DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD. et al'

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 29 June 2000 (29.06.00) under No. WO 00/37632

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Feilding CJ. et al.	1-2
Y	"Molecular physiology of reverse cholesterol transport", J.Lipid Research(1995), Vol.36 , No.2 , p.211-228	3-8
Y	Fielding PE. et al., "Unique epitope of apolipoprotein A-1 expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol", Biochemistry(1994), Vol.33 , No.22 , p.6981-6985	1-8
Y	Gursky O. et al., "Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state", Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1996), Vol.93 , No.7 , p.2991-2995	6-8
PY	Sparks DL. et al., "Effect of apolipoprotein A-1 lipidation on the formation and function of pre-beta and alpha -migrating LpA-1 particles", Biochemistry(1999 Feb), Vol.38 , No.6 , p.1727-1735	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 March, 2000 (13.03.00)

Date of mailing of the international search report
21 March, 2000 (21.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/071062


C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Miida T.et al., "Mechanism of transfer of LDL-derived free cholesterol to HDL subfractions in human plasma", Biochemistry(1990), Vol.29 , No.46 , p.10469-10474	1-8
A	Bekaert ED.et al., "Competitive enzyme inhibition immunoassay of apolipoprotein A-1: use of monoclonal antibodies", Clin. Chem. (1988), Vol.34 , No.6 , p.1030-1035	1-8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THE FOLLOWING IS THE ENGLISH TRANSLATION OF THE
ANNEXES TO THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT : AMENDED SHEET (Page 21)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Claims

1. A monoclonal antibody reacting specifically with (1) a human apolipoprotein A-I occurring in HDL which contains no human apolipoprotein A-II and has a molecular weight of 150,000 or less and (2) a human apolipoprotein A-I not binding to a lipid.

2. The monoclonal antibody as described in claim 1, wherein the HDL (1) which contains no human apolipoprotein A-II and has a molecular weight of 150,000 or less is pre β 1-HDL.

3. A hybridoma for producing the monoclonal antibody as recited in claim 1 or 2.

4. An immunoassay method for a human apolipoprotein A-I, characterized by reacting the monoclonal antibody as recited in claim 1 or 2 with a specimen.

5. The method as described in claim 4, which is performed through RIA or EIA.

6. The method as described in claim 4 or 5, wherein measurement is performed before and after heating the specimen, and the amount of reduction or percent reduction after heating is determined.

7. A reagent for assaying a human apolipoprotein A-I containing the monoclonal antibody as recited in claim 1 or 2.

8. The reagent according to claim 7, which is for RIA or EIA.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Feilding CJ. et al.	1-2
Y	"Molecular physiology of reverse cholesterol transport", J.Lipid Research(1995), Vol.36 , No.2 , p.211-228	3-8
Y	Fielding PE. et al., "Unique epitope of apolipoprotein A-1 expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol", Biochemistry(1994), Vol.33 , No.22 , p.6981-6985	1-8
Y	Gursky O. et al., "Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state", Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1996), Vol.93 , No.7 , p.2991-2995	6-8
PY	Sparks DL. et al., "Effect of apolipoprotein A-1 lipidation on the formation and function of pre-beta and alpha -migrating LpA-1 particles", Biochemistry(1999 Feb), Vol.38 , No.6 , p.1727-1735	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 March, 2000 (13.03.00)

Date of mailing of the international search report
21 March, 2000 (21.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/071063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Miida T. et al., "Mechanism of transfer of LDL-derived free cholesterol to HDL subfractions in human plasma", Biochemistry(1990), Vol.29 , No.46 , p.10469-10474	1-8
A	Bekaert ED. et al., "Competitive enzyme inhibition immunoassay of apolipoprotein A-1: use of monoclonal antibodies", Clin. Chem. (1988), Vol.34 , No.6 , p.1030-1035	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Feilding CJ. et al. "Molecular physiology of reverse cholesterol transport", J.Lipid Research(1995), Vol.36, No.2, p.211-228	1-2 3-8
Y	Fielding PE. et al., "Unique epitope of apolipoprotein A-1 expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol", Biochemistry(1994), Vol.33, No.22, p.6981-6985	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.03.00	国際調査報告の発送日 21.03.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 真由美 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Gursky O. et al., "Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), Vol. 93 , No. 7 , p. 2991-2995	6 - 8
P Y	Sparks DL. et al., "Effect of apolipoprotein A-1 lipidation on the formation and function of pre-beta and alpha -migrating LpA-1 particles", Biochemistry (1999 Feb), Vol. 38 , No. 6 , p. 1727-1735	1 - 8
A	Miida T. et al., "Mechanism of transfer of LDL-derived free cholesterol to HDL subfractions in human plasma", Biochemistry (1990), Vol. 29 , No. 46 , p. 10469-10474	1 - 8
A	Bekaert ED. et al., "Competitive enzyme inhibition immunoassay of apolipoprotein A-1: use of monoclonal antibodies", Clin. Chem. (1988), Vol. 34 , No. 6 , p. 1030-1035	1 - 8

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 16 MAR 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 FP-DC-0041	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/07106	国際出願日 (日.月.年) 17.12.99	優先日 (日.月.年) 22.12.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577		
出願人(氏名又は名称) 第一化学薬品株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 1 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.06.00	国際予備審査報告を作成した日 02.03.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 上 條 肇 印	4 N 9 8 3 9
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-13 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2-8 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 1 項、 12.09.00 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-8 ~~ページ~~図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-8

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-8

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-8

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Feilding CJ., et al., "Molecular physiology of reverse cholesterol transport", J.Lipid Research(1995), Vol. 36, No. 2, p. 211-228

文献2: Fielding PE. et al., "Unique epitope of apolipoprotein A-1 expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol", Biochemistry(1994), Vol. 33, No. 22, p. 6981-6985

文献3: Gursky O. et al., "Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996), Vol. 93, No. 7, p. 2991-2995

【請求項1-8】

引用文献1には、ヒトアポリポ蛋白質A-IIを持たないHDL及び脂質と結合していないヒトアポリポ蛋白質A-I、prebeta-1 HDLのヒトアポリポ蛋白質A-Iのモノクローナル抗体について記載されていると認める。

引用文献2には、血漿中のprebeta-1 HDLを認識するマウス抗アポリポ蛋白質A-1に対するモノクローナル抗体が記載されている。

引用文献3には、ヒトアポリポ蛋白質A-Iが、温度に依存して変性する旨記載され、5℃、25℃、40℃における3次元構造の変化についても記載されている(要すれば、Fig.3 参照)。

モノクローナル抗体を産生させるためにハイブリドーマを作成すること、モノクローナル抗体を用いて抗原を検出すること、免疫的検出手段として、RIA、EIAは、本願優先日当時、周知な技術であったと認める。

HDLとは、リン脂質、コレステロール、蛋白質、トリグリセリドを含むリポタンパク質であり、リン脂質、コレステロール等の構成成分の種類、配合割合等により、様々な分子量のHDLがヒト血漿に含まれることは周知な事項であることから、分子量15万以下のアポA-IIを持たないHDLも、ヒト血漿中に含まれると認められる。

引用文献1、2に記載される発明において、分子量で限定されていないapoA-IIを持たなく、脂質と結合していないHDLのうち、分子量15万以下のアポA-IIを持たないHDLを選択し、その分子量15万以下のHDLに対するモノクローナル抗体を作製しようとすることは、当業者が容易に想到しうるものであると認められる。

そして、引用文献1、2に記載される、ヒト、マウスのアポリポ蛋白質A-Iに対するモノクローナル抗体は、引用文献3に記載される「ヒトアポリポ蛋白質A-Iが温度に依存して変性す

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V. 欄の続き

る」3次構造の変化を検出することができるモノクローナル抗体であること、上記周知技術を適用し、該モノクローナル抗体を免疫学的検出、RIA、EIAに用いることは、当業者が容易に想到しうるものであると認められる。

また、分子量15万以下のHDLを選択することの発明の効果も、格別のものと認められない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請求の範囲

1. (補正後) (a) (1) 分子量が15万以下で、かつヒトアポリポ蛋白質A-IIを持たないHDLに存在するヒトアポリポ蛋白質A-I及び(2)脂質と結合していないヒトアポリポ蛋白質A-Iと特異的に反応し;
(b) (1) ヒトアポリポ蛋白質A-IIを含むHDL、(2) VLDL、
(3) LDL、及び(4) HDL2と反応せず;
(c) 37℃加温後の血漿又は血清に対する反応性が、加温前の当該反応性に比べて低下する、モノクローナル抗体。
2. (1) 分子量が15万以下で、かつヒトアポリポ蛋白質A-IIを持たないHDLが、pre β 1-HDLである請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
4. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を検体に反応させることを特徴とするヒトアポリポ蛋白質A-Iの免疫学的測定法。
5. 測定手段が、RIA又はEIAである請求項4記載の測定法。
6. 検体加温前と加温後に測定し、加温後の減少量又は減少率を測定するものである請求項4又は5記載の測定法。
7. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を含有するヒトアポリポ蛋白質A-Iの測定試薬。
8. 測定手段が、RIA又はEIAである請求項7記載の測定試薬。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 F P - D C - 0 0 4 1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 7 1 0 6	国際出願日 (日.月.年) 1 7 . 1 2 . 9 9	優先日 (日.月.年) 2 2 . 1 2 . 9 8
出願人(氏名又は名称) 第一化学薬品株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 1 8 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08,
G01N 33/53, G01N 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Feilding CJ. et al. "Molecular physiology of reverse cholesterol transport", J.Lipid Research(1995), Vol.36, No.2, p.211-228	1-2 3-8
Y	Fielding PE. et al., "Unique epitope of apolipoprotein A-1 expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol", Biochemistry(1994), Vol.33, No.22, p.6981-6985	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.03.00

国際調査報告の発送日

21.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Gursky O. et al., "Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), Vol. 93 , No. 7 , p. 2991-2995	6 - 8
P Y	Sparks DL. et al., "Effect of apolipoprotein A-1 lipidation on the formation and function of pre-beta and alpha -migrating LpA-1 particles", Biochemistry (1999 Feb), Vol. 38 , No. 6 , p. 1727-1735	1 - 8
A	Miida T. et al., "Mechanism of transfer of LDL-derived free cholesterol to HDL subfractions in human plasma", Biochemistry (1990), Vol. 29 , No. 46 , p. 10469-10474	1 - 8
A	Bekaert ED. et al., "Competitive enzyme inhibition immunoassay of apolipoprotein A-1: use of monoclonal antibodies", Clin. Chem. (1988), Vol. 34 , No. 6 , p. 1030-1035	1 - 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

特許協定条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12N 15/08, C07K 16/18, C12N 5/12, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577	A1	(11) 国際公開番号 WO00/37632 (43) 国際公開日 2000年6月29日 (29.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/07106 (22) 国際出願日 1999年12月17日 (17.12.99) (30) 優先権データ 特願平10/364295 1998年12月22日 (22.12.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP] 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo, (JP) (72) 出願人 ; および (75) 発明者 宮崎 修 (MIYAZAKI, Osamu) [JP/JP] 深町 勇 (FUKAMACHI, Isamu) [JP/JP] 〒319-1112 茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬品株式会社 診断薬研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (DE, FR, GB) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示。
(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST APOLIPOPROTEIN A-I (54) 発明の名称 アポリポ蛋白質A-Iに対するモノクローナル抗体 (57) Abstract A monoclonal antibody reacting specifically with (1) apoA-I having a molecular weight of not more than 150,000 and occurring in HDL free from apoA-II; and (2) apoA-I not binding to a lipid; a hybridoma producing this antibody; a method of immunologically assaying apoA-I characterized by reacting the antibody with a specimen; and an assay reagent for apoA-I which contains the antibody. The specific apoA-I thus assayed is usable as a novel indication of lipid metabolic error, etc.		

(57)要約

本発明は、(1)分子量が15万以下で、かつアポA-IIを持たないHDLに存在するアポA-I及び(2)脂質と結合していないアポA-Iと特異的に反応するモノクローナル抗体、この抗体を産生するハイブリドーマ、この抗体を検体に反応させることを特徴とするアポA-Iの免疫学的測定法並びにこの抗体を含有するアポA-Iの測定試薬に関する。特定のアポA-Iの測定が可能となり、脂質代謝異常等の新たな指標となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

アポリポ蛋白質A-Iに対するモノクローナル抗体

技術分野

本発明は、特定のヒトアポリポ蛋白質A-I（以下、「アポA-I」という）に対するモノクローナル抗体、これを用いた特定のアポA-Iの免疫学的測定方法及びこれを含有する免疫学的測定試薬に関するものである。

背景技術

アポA-IはHDLを構成する主なアポタンパク質であり、HDLの末梢細胞から肝臓へのコレステロールを逆転送する機能において中心的な役割を果たしているものである。（Philips M. C. et al. Biochem. Biophys. Acta, 906:p. 223(1987)）。このことから、動脈硬化症の診断にアポA-Iを測定することが行われている。

近年、アポリポ蛋白質A-II（以下、「アポA-II」という）を持たないアポA-I含有HDL（石塚ら：医学と薬学、39巻5号、1041頁、1988）が、アポA-I及びアポA-II含有HDLより細胞からのコレステロール引き抜き作用が強いことや、脂質とは結合せずに存在するアポA-Iや小粒子で脂質含量の少ないpre β 1-HDL（T. Miida. et al. Biochemistry, 29:p.10469 (1990)）に存在するアポA-Iが細胞からのコレステロールの逆転送系において重要な役割を演じていることが判明したことから、これら特定のアポA-Iを測定することが重要となってきた。アポA-IIを持たないアポA-I含有HDLのうち、pre β 1-HDLは、細胞表面との特異的な相互作用を介して末梢細胞からコレステロールを引き抜き（Fielding, C. et al. Lipid Res., 36: p211-228(1995)）、その作用はHDLよりも効率的であることから、特に注目されてい

る。

しかしながら、特定の Apo A-I と選択的に反応する抗体がなかったため目的とする Apo A-I を電気泳動法、免疫沈殿法等で他の Apo A-I と分離する必要があり、簡便に測定するのは不可能であった。

発明の開示

このような実情において、本発明者は鋭意研究を行った結果、特定の Apo A-I に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を得ることに成功し、これを用いれば、前記の脂質とは結合せずに存在する Apo A-I や pre β 1-HDL を構成する Apo A-I 等の Apo A-I が正確かつ容易に測定でき、脂質代謝異常をより正確に診断できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、(1) 分子量が 15 万以下で、かつ Apo A-II を持たない HDL に存在する Apo A-I 及び (2) 脂質と結合していない Apo A-I と特異的に反応するモノクローナル抗体を提供するものである。

また本発明は、このモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

また本発明はこのモノクローナル抗体を検体に反応させることを特徴とする Apo A-I の免疫学的測定法を提供するものである。

さらに本発明は、このモノクローナル抗体を含有する Apo A-I の測定試薬を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、ウェスタンブロット法（電気泳動）による本発明抗体の特異性を示す図である。図 2 は、ELISA 法による本発明抗体の特異性を示す図である。図 3 は、ゲル濾過分離した分画に対する本発明抗体の反応性を示す図である。図 4 は、二次元電気泳動法による本発明抗体の特異性を示す図（電気泳動像）である。

図5は、本発明抗体を用いたELISA法での希釈直線性を示す図である。図6は、臨床検体のpre β 1-HDL値の測定結果を示す図である。図7は、臨床検体の加温後のpre β 1-HDL値を示す図である。図8は、臨床検体の加温によるpre β 1-HDL値の減少率を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のモノクローナル抗体は、例えば次の方法で製造することができる。

免疫原としてはアポA-Iを含むリポタンパク質又は精製したアポA-Iを用いる。免疫に使用する動物としては特に限定されないが、一般的にはマウス、ラットなどが使用される。免疫方法は、一般的な手法に従って行うことができる。例えば、免疫原を通常の緩衝液や生理食塩水に懸濁させたもの、あるいは、フロインド・コンプリート・アジュバンドなどの補液との混合物を、動物の皮下、皮内、腹腔などに投与して一時刺激後、必要に応じて同様の操作を繰り返し行う方法が挙げられる。抗原の投与量は投与経路、動物種に応じて適宜決定されるが、通常の投与量は、1回当たり10 μ g～1mg程度とするのが適当である。細胞融合に用いる免疫細胞は、最終免疫の3～4日後に摘出した脾臓細胞が好適である。また、前記免疫細胞と融合させる他方の親細胞としての骨髓腫細胞（ミエロマ細胞）としては既に確立されている公知の各種細胞株、例えば、マウスにおけるNS1（P3/NS1/I-Ag4444-1）〔Eur. J. Immunol. 6:511-519（1976）〕、SP2/O-Ag14〔Nature 276:269（1978）〕、P3X63-Ag8.653〔J. Immunol. 123:1548（1979）〕、P3X63-Ag8U.1〔Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1（1978）〕等や、ラットにおけるY3-Ag1.2.3〔Nature 277:131-133（1979）〕、YB2/O（YB2/3HL/P2.G11.16Ag.20）〔Methods Enzymol. 73B:1（1981）〕等が挙げられ、これらは何れも使用することができる。細胞融合には通常用いられるポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等を使用することができる。細胞融合

は通常の方法と同様にすればよく、例えば免疫細胞は骨髓細胞に対して約 1 ～ 10 倍で、ポリエチレングリコールは平均分子量 1000 ～ 6000 のものを 30 ～ 60 % の濃度で使用し、免疫細胞と骨髓細胞の混合ペレットに滴下し混ぜ合わせる方法が挙げられる。ハイブリドーマの選択は、通常の選択培地、例えば HAT 培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地）を用いて行えばよい。

HAT 培地で培養後、得られたハイブリドーマは、通常の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索及び単一クローン化が行われる。目的とする抗体の産生株の検索には、例えば、ELISA 法、RIA 法等が利用でき、これによりある特定の ApoA-I に対してのみ特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

本発明のモノクローナル抗体を選択するには、次のような方法が挙げられる。

まず、培養上清中のモノクローナル抗体を抗マウス IgG 抗体等を介して固相化し、これに血漿などのリポタンパク質混合液を反応させる。次に、酵素などで標識した抗 ApoA-I 抗体又は同じく標識した ApoA-II に対する抗体を反応させ、抗 ApoA-I 抗体の系のみ反応し、且つ抗 ApoA-II 抗体の系とは反応しないモノクローナル抗体を選択する。

このようなモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしては、本発明者が見出したハイブリドーマ 55201 が挙げられ、このハイブリドーマ 55201 は、工業技術院生命工学工業技術研究所（〒305-8566 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に FERM BP-6938 として寄託されている（原寄託日、1998 年 11 月 17 日）。

かくして得られる抗体産生ハイブリドーマからの抗体の製造は、常法に従いハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、あるいは、前記ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳類動物に投与し、腹水として回収する方法により実施できる。

本発明のハイブリドーマ55201が産生するモノクローナル抗体55201は次の性質を有する。

(A) (1) 分子量が15万以下で、かつアポA-IIを持たないHDLに存在するアポA-I及び(2) 脂質と結合していないアポA-Iに反応する。

(B) ヒト健常者血漿を超速心分離装置でVLDL、LDL、HDL2、HDL3及びボトム(Bottom)の5つの画分に分離したとき、HDL3及びボトム画分中のアポA-Iに反応する。

上記(A)における、(1) 分子量が15万以下で、かつアポA-IIを持たないHDLとしては、pre β 1-HDLが特に好ましい。

本発明の前記抗体を用いて、従来の任意の免疫学的測定方法により、ヒト検体中の特定のアポA-Iを測定することができる。検体としては血漿又は血清が用いられる。用いることのできる免疫学的測定方法としては、通常の競合法、サンドイッチ法によるRIA又はEIA等が挙げられる。これらの方法の実施にあたっては、本発明抗体の標識体を用いることもできる。ここで標識物質としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、 β -ガラクトオキシダーゼ等の酵素； ^{125}I 、 ^{131}I 、トリチウム等の放射性物質が挙げられる。また、抗体を固相化するための単体としては、各種プラスチックウェル、各種プラスチックビーズ等が挙げられる。

例えば、ELISA法で測定する場合には、精製したアポA-Iを標準品として次のような方法で定量することができる。即ち、本発明のモノクローナル抗体を固相化したELISAプレートに、希釈した試料を添加し反応させた後、酵素標識した抗アポA-Iポリクローナル抗体を反応させ、発色後吸光度の変化から試料中に存在するアポA-Iを定量する方法が挙げられる。

なお、これらの測定は、通常の免疫学的測定法と同様に0～40℃のいずれの温度で行うこともできる。

前記のように本発明のモノクローナル抗体を用いれば、血漿又は血清中の前記

(A) のアポA-I (1) 及び／又は (2) が測定できるが、加温前の検体の測定値に比べて 37℃加温後の検体の測定値は著しく低下する。このことから、血漿又は血清中に存在する前記 (A) のアポA-I は 37℃に加温したときに減少することが判明した。従って、この性質を利用することによっても検体中の前記 (A) のアポA-I を定量することができる。すなわち、検体加温前と加温後に上記の免疫学的測定法により前記 (A) のアポA-I 量を測定し、加温による測定値の減少量又は減少率を測定すればよい。かくすることによっても前記 (A) のアポA-I の定量が可能となる。ここで、検体の加温前の温度は 0～25℃、加温後の温度は 30～40℃とするのが好ましい。また、加温前の検体には、0～10℃に低温保存した検体も含まれる。

これらの測定法により、血漿又は血清中の前記 (A) のアポA-I (1) 及び／又は (2) が正確かつ容易に測定できる。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例 1 (モノクローナル抗体の調製)

(1) ハイブリドーマの調製

ヒト健常者プール血清から超遠心分離法により HDL を分離し、これをエタノールとエーテルの混合液及びエーテルにて脱脂した。つづいて窒素ガスにてエーテルを完全に除去後、8 M 尿素溶液にて再溶解し、セファクリル S200 カラム (Pharmacia 社製) を用いゲル濾過を行った。分離した各フラクションからアポA-I を含むフラクションをプールし、PBS で透析後免疫原とした。この免疫原と完全フロイントアジュバンド (GIBCO 社製) とを 1 対 1 で混和乳化し、0.1 mg/0.1 mL (エマルジョン) で 6 週齢の雌 BALB/C マウスの皮下に 1 週間間隔で 6 回投与後、最終免疫の 2 日後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓が

ら得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞SP2/O-Ag14とを6対1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール1540（和光純薬工業（株）社製）存在下にて細胞融合させた。融合細胞は脾臓細胞として 2.5×10^6 /mLになるようにHAT培地に懸濁し、96穴培養プレート（CORNING社製）に0.2mLずつ分注した。これを5%CO₂インキュベーター中で37°Cにて培養し、およそ2週間後に、ハイブリドーマの生育してきたウェルの培養上清について、次に示すELISA法にしたがって有望抗体産生株を選択した。即ち、まず、マイクロプレート（NUNC社製）にヤギ抗マウスIgG（Fc）抗体（JACKSON社製）を介し、各培養上清中のIgGを固相化した。これにヒト健常者血漿希釈液を添加し、アポA-Iを含むリポタンパク質（主にHDL）を反応させた。つづいて、アポA-Iを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-I抗体をビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド（ZYMED社製）を用いビオチン化したビオチン標識抗アポA-I抗体、もしくはアポA-IIを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-II抗体を同様にビオチン化したビオチン標識抗アポA-IIを反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ZYMED社製）を反応後、オルトフェニレンジアミン（東京化成社製）を含む基質溶液で発色させた。これをマイクロプレートリーダー（A. 492）で測定し、ビオチン標識抗アポA-I抗体を用いた系で高い反応性を示し、且つビオチン標識抗アポA-II抗体を用いた系では反応性を示さなかった株を選択した。このハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化を行い、モノクローナル抗体ハイブリドーマ55201を作製した。

（2）モノクローナル抗体の調製

あらかじめ2週間前にプリスタン0.5mLを腹腔内に注射しておいた12週齢の雌BALB/Cマウスに、ハイブリドーマ55201を細胞数 0.5×10^6 個の量で腹腔内に投与した。約14日後に腹水を採取し、遠心処理して上清を得た。上清を等量の吸着用緩衝液（3M NaCl-1.5M グリシン-NaOH, pH8.5）と混和後、濾過した。この濾液を吸着用緩衝液で平衡化し

たプロテインAカラム（ファルマシア）に通して抗体をカラムに吸着させた後、0.1Mクエン酸緩衝液（pH3.0）で溶出させてモノクローナル抗体55201を精製した。

実施例2（モノクローナル抗体の特異性）

（1）ウェスタンブロット法

実施例1で得た抗体が、アポA-Iに対する抗体であることを確認するため、ウェスタンブロット法により解析した。即ち、ヒト健常者血清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF膜（ミリポア社製）に電氣的に転写し、3%スキムミルクを含むPBST（0.05%Tween 20を含むPBS）で1時間ブロッキング後、一次抗体としてモノクローナル抗体55201を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（AMERICAN QUALEX社製）を反応させた。PVDF膜をPBSTで洗浄後、ジアミノベンジジンを基質として加え、発色させた。図1に示す如く、モノクローナル抗体55201は分子量28000のアポA-Iに対するバンドのみ認められ、アポA-Iに対する特異抗体であることが確認された。

（2）ELISA法

実施例1で得たモノクローナル抗体（55201）を20mMリン酸緩衝生理食塩水（PBS；pH7.2）で3μg/mLの濃度に調整後、96穴ELISAプレート（ヌンク社製）に50μL/ウェル加え、4℃で一夜インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄後、ブロッキング液（1%BSAを含むPBS）を100μL/ウェル加え、1時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、ブロッキング液にて希釈したヒト健常者血漿希釈液を50μL/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。ブロッキング液で3回洗浄した後、ビオチン標識ヤギ抗アポA-I抗体、もしくはビオチン標識抗アポA-II抗体を50μL/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。同様にブロッキング液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、室温で30分間イ

ンキュベートした。再びブロッキング液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液を50 μ L/ウェル加えた。10分後、1.5N硫酸を50 μ L/ウェル加え、492nmにおける吸光度を測定した。

この結果を図2に示す。図2より、モノクローナル抗体55201はアポA-IIを含むHDLとは反応せず、アポA-Iのみを含むHDLと特異的に反応することが示された。

(3) ゲル濾過分離画分に対する反応性

実施例1で得た抗体の特異性を検討するため、ヒト健常者血漿をゲル濾過にて分離し、その分離した各画分に対する反応性を調べた。即ち、ヒト健常者血漿をゲル濾過用カラム4本(TSK-GEL G3000SW、7.5mm ID \times 60cm 2本、同G3000SW、7.5mm ID \times 30cm 1本、ファルマシア スーパーデックス200HR10/30)を接続させたファルマシア FPLCシステムにて分離し、各フラクションのアポタンパク濃度を測定するとともに、以下に示すELISA法にて各モノクローナル抗体の反応性を比較した。実施例1で得たモノクローナル抗体55201を20mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS; pH7.2)で3 μ g/mLの濃度に調整後、96穴ELISAプレート(ヌンク社製)に50 μ L/ウェル加え、4°Cで一夜インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄後、ブロッキング液(1%BSA-PBS)を100 μ L/ウェル加え、1時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、ブロッキング液にて希釈した各フラクション又は精製アポA-Iを50 μ L/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。ブロッキング液で3回洗浄した後、アポA-Iを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-I抗体を過ヨウ素酸法にてペルオキシダーゼ標識したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗アポA-I抗体を50 μ L/ウェル加え、室温で1時間インキュベートした。同様にブロッキング液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液を50 μ L/ウェル加えた。10分後、1.5N硫酸を50 μ L/ウェル加え、492nmにおける吸光度を測定し、精製アポA

— I を標準品として、各フラクションのアポ A — I 量を算出した。この結果を図 3 (下) に示す。尚、アポ A — I、A — II、E の各アポタンパク質は、各精製アポタンパクを山羊に免疫して得たポリクローナル抗体及びこれを過ヨウ素酸法によりペルオキシダーゼ標識した標識抗体を用いた E L I S A 法で測定した。この結果を図 3 (上) に示す。図 3 (下) より、モノクローナル抗体 5 5 2 0 1 は主に血漿中に存在する分子量 6. 7 万以下の H D L に存在するアポ A — I、もしくは脂質と結合せずに存在するアポ A — I に対して反応することが示された。

(4) 超遠心分離画分に対する反応性

実施例 1 で得たモノクローナル抗体 5 5 2 0 1 の特異性を検討するため、ヒト健常者血漿 3 0 m L を超遠心分離装置 (日立) で V L D L、L D L、H D L 2、H D L 3、及びボトム of the 5 つの画分に分離し、5 5 2 0 1 抗体と反応する粒子がどの画分に存在するか調べた。即ち、実施例 2 (3) と同様の E L I S A 法で精製アポ A — I を標準品として分離した画分中のアポ A — I 量を測定した。この結果を表 1 に示す。表 1 より、モノクローナル抗体 5 5 2 0 1 と反応する血漿中の成分は V L D L、L D L 及び H D L 2 の中にはほとんど存在せず、H D L 3 とボトム中に存在することが判明した。このことから、5 5 2 0 1 抗体が H D L 2 のような比重の低い画分に存在するアポ A — I とは反応せず、比重の高い H D L 3 及びボトムに存在するアポ A — I と反応することが示された。

表 1

分離画分	比重	apoA-I (μ g) *
V L D L	<1.006	0
L D L	1.006~1.063	1 2
H D L 2	1.063~1.125	2 4
H D L 3	1.125~1.21	1 2 9 6
B o t t o m	1.21<	1 7 8 5

*: 5 5 2 0 1 抗体と反応する粒子中の apoA-I 量

(5) p r e β 1 — H D L との反応

実施例 1 で得たモノクローナル抗体 5 5 2 0 1 の特異性を検討するため、非変

性二次元電気泳動法による解析を行った。即ち、ヒト健常者の血漿にモノクローナル抗体 55201 もしくはノーマルマウス IgG を添加後、まず、0.75% のアガロース電気泳動を行い、そのアガロース切片を切り出しポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。これをニトロセルロース膜（ミリポア社）に電氣的に転写し、 ^{125}I 標識したヤギ抗アポ A-I 抗体を反応させ、オートラジオグラフィーを用い HDL 亜分画の変化を比較した。この結果を図 4 に示す。コントロールとして用いたノーマルマウス IgG の系に比べ、モノクローナル抗体 55201 を加えた系は pre β 1-HDL のスポットが消失するとともに IgG と pre β 1-HDL とのコンプレックスと考えられるスポットが認められた。一方、pre β 1-HDL 以外の HDL のスポットには変化が見られなかった。このことから、モノクローナル抗体 55201 が pre β 1-HDL に対して特異的に反応することが判明した。

(6) 37°C 加温後の pre β 1-HDL 値

実施例 1 で得たモノクローナル抗体 55201 の特異性を検討するため、4°C で保存しておいたヒト健常者血漿 0.2 mL をマイクロチューブに分注後、37°C で 2 時間インキュベートし、抗体との反応性に与える影響を調べた。即ち、実施例 2 (3) と同様の ELISA 法で精製アポ A-I を標準品としてインキュベート前とインキュベート後の血漿中の pre β 1-HDL 濃度を測定した。この結果を表 2 に示す。表 2 より、37°C でのインキュベート後、反応性が著しく低下することから、血中の pre β 1-HDL は加温により減少することが判明した。

表 2

	測定値 ($\mu\text{g/mL}$)	
	インキュベート前	インキュベート後
検体 1	19.9	2.1
検体 2	20.1	2.7
検体 3	16.9	4.0
検体 4	20.7	5.0
検体 5	21.8	2.2

実施例 3 (測定方法)

実施例 1 で得た抗体を用い、ヒト血漿中の $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度を測定した。即ち、精製アポ A-I を標準品としてヒト健常者血漿 3 検体を実施例 2 (3) と同様の ELISA 法で測定した結果、図 5 に示す如く、3 検体とも良好な希釈直線性を示し、 $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度を測定できることが示された。

実施例 4 (臨床検体の測定)

実施例 3 で確認された $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 測定系の臨床的意義について検討するため、4℃で保存しておいた高脂血症患者の血漿 39 検体及び健常者の血漿 11 検体について、37℃加温前後の血漿中の $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度を実施例 2 (3) と同様の ELISA 法で測定した。また、対照として従来の技術である血漿中の全アポ A-I 濃度を、37℃加温前の血漿を用いて免疫比濁法により測定した。

加温前血漿中の、全アポ A-I 濃度及び $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度を図 6 に示す。全アポ A-I 濃度は患者と健常者で明確な差は認められなかったのに対し、 $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度では患者と健常者で著しい差が認められた。

加温後の $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度を図 7 に示す。健常者での加温後の $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 値は平均で $3.8 \mu\text{g/mL}$ に対し、患者では平均で $12.2 \mu\text{g/mL}$ となり、患者と健常者で著しい差が認められた。

加温前後での $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度の減少率を図 8 に示す。健常者での加温による減少率は平均で、79.1% に対し、患者では平均で 68.5% となり、患者と健常者で著しい差が認められた。

以上の結果は、加温処理前後の $\text{pre } \beta 1\text{-HDL}$ 濃度及び、加温後の減少量又は減少率の測定が脂質代謝異常を示す指標として有用であることを示す。

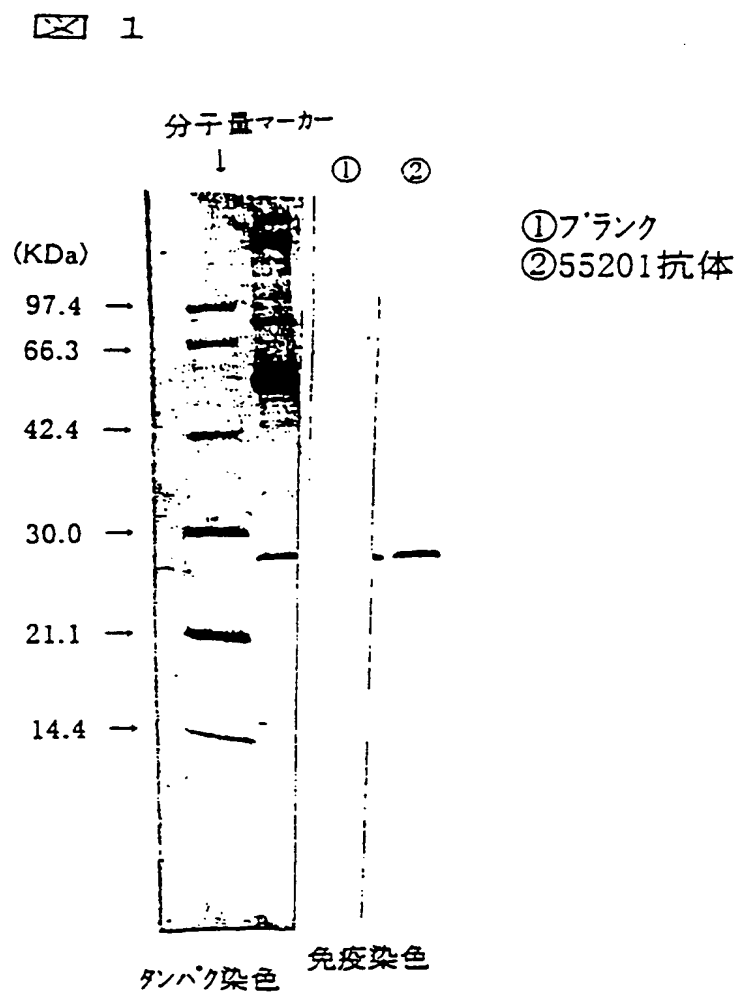
産業上の利用可能性

本発明の特定のアポ A-I に特異的に反応する抗体を使用することにより、ヒ

ト体液中の特定の ApoA-I を測定することが可能となり、脂質代謝異常等の新たな指標がもたらされる。

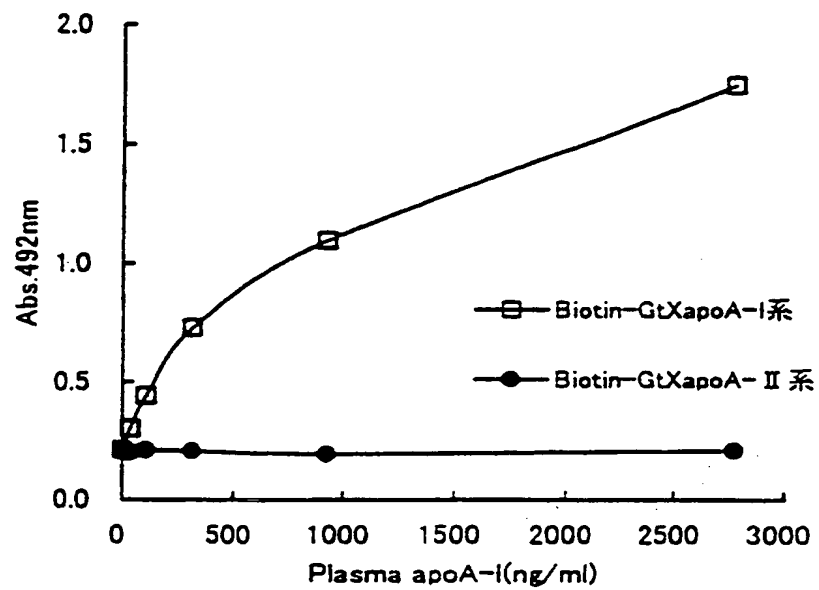
請 求 の 範 囲

1. (1) 分子量が15万以下で、かつヒトアポリポ蛋白質A-IIを持たないHDLに存在するヒトアポリポ蛋白質A-I及び(2) 脂質と結合していないヒトアポリポ蛋白質A-Iと特異的に反応するモノクローナル抗体。
2. (1) 分子量が15万以下で、かつヒトアポリポ蛋白質A-IIを持たないHDLが、pre β 1-HDLである請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
4. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を検体に反応させることを特徴とするヒトアポリポ蛋白質A-Iの免疫学的測定法。
5. 測定手段が、RIA又はEIAである請求項4記載の測定法。
6. 検体加温前と加温後に測定し、加温後の減少量又は減少率を測定するものである請求項4又は5記載の測定法。
7. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を含有するヒトアポリポ蛋白質A-Iの測定試薬。
8. 測定手段が、RIA又はEIAである請求項7記載の測定試薬。



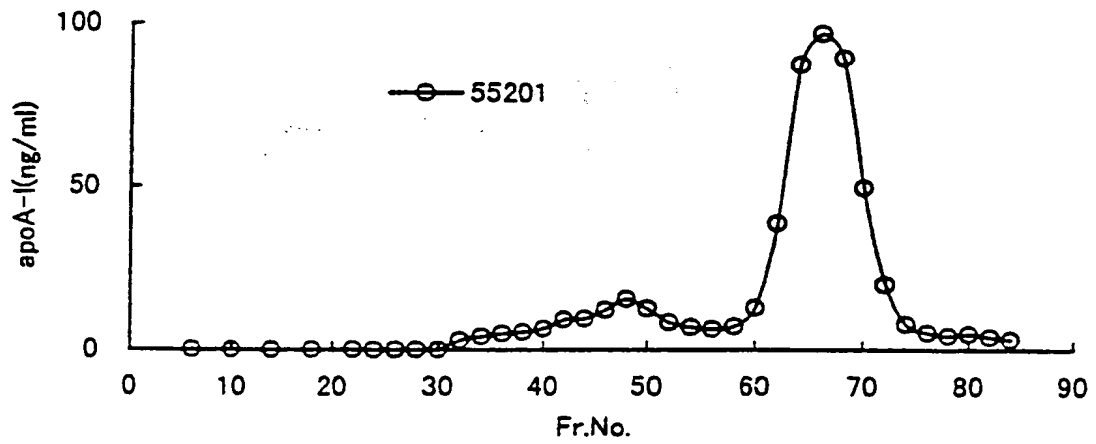
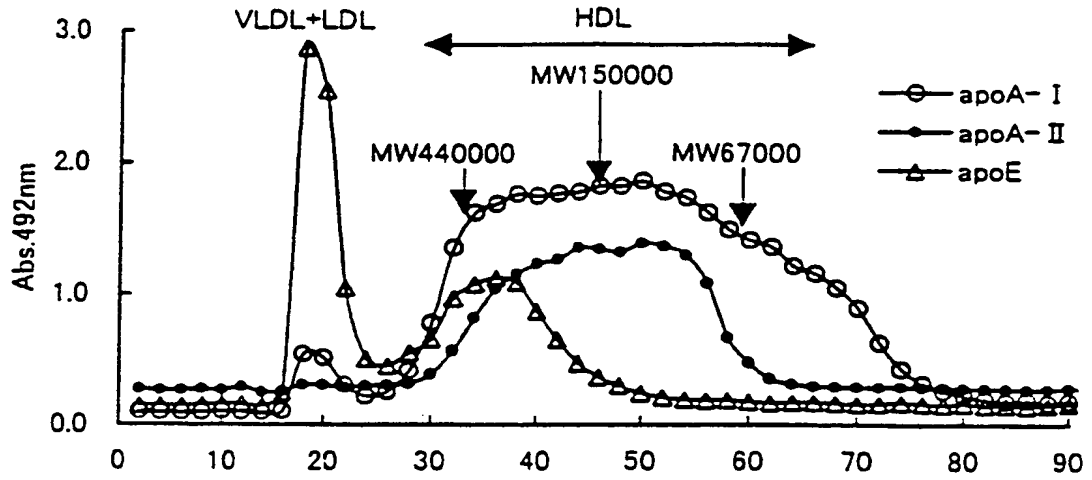
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3

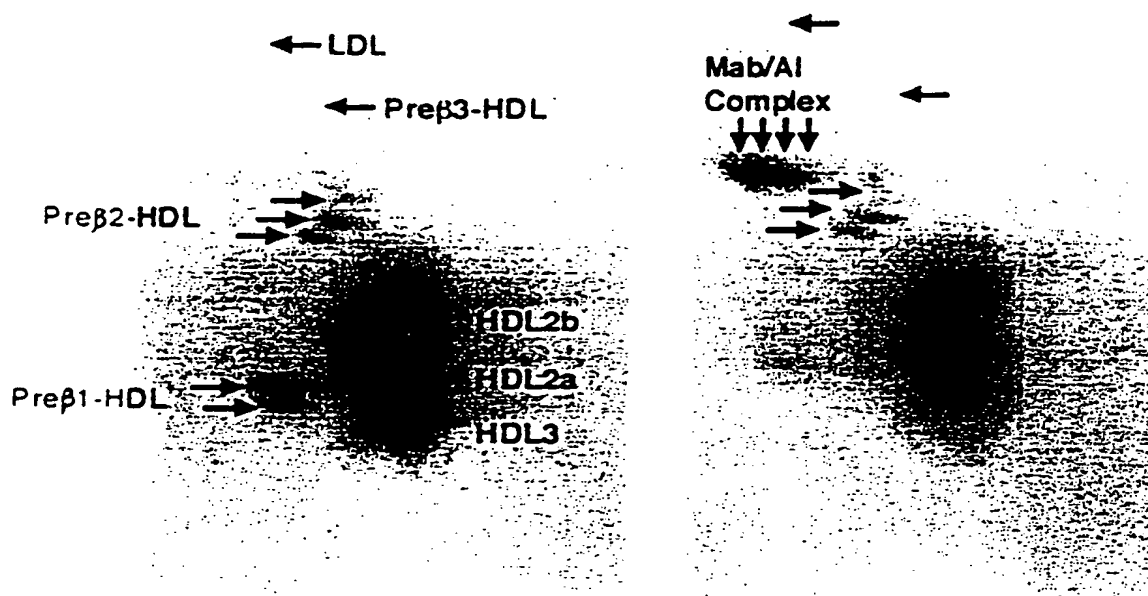


THIS PAGE BLANK (USPTO)

4

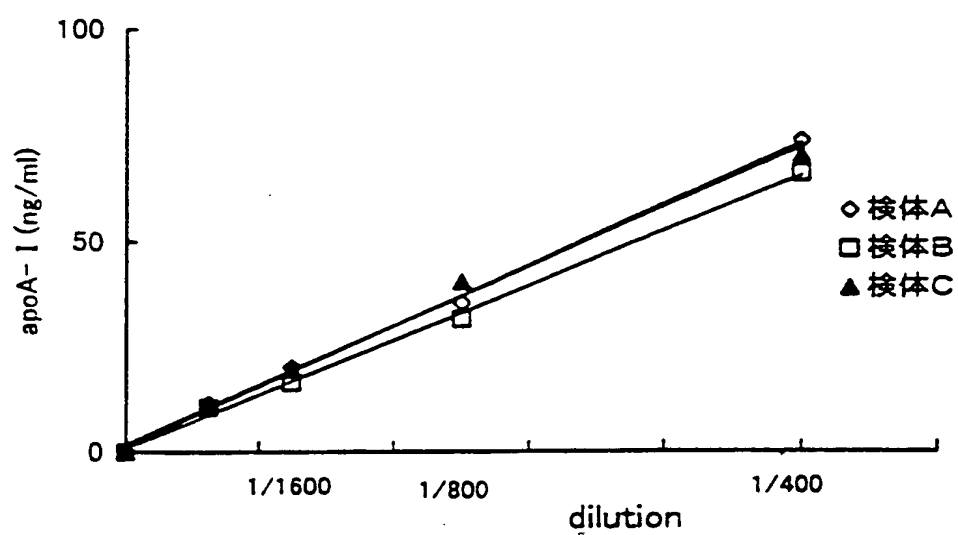
A: Control

B: Mab55201

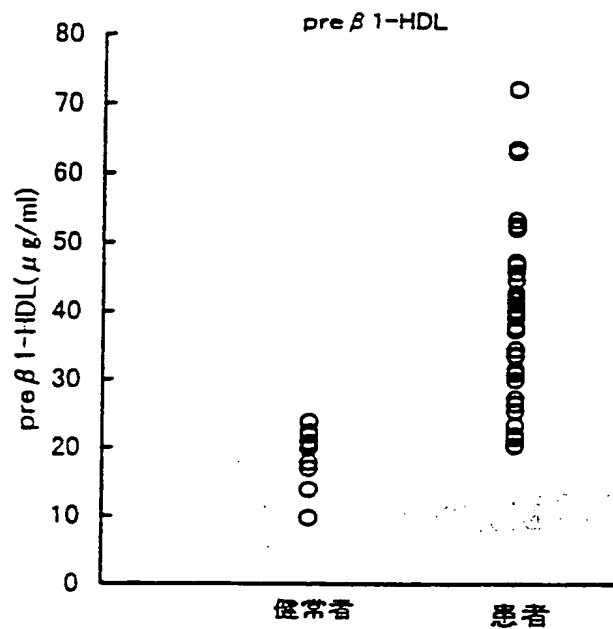


THIS PAGE BLANK (USPTO)

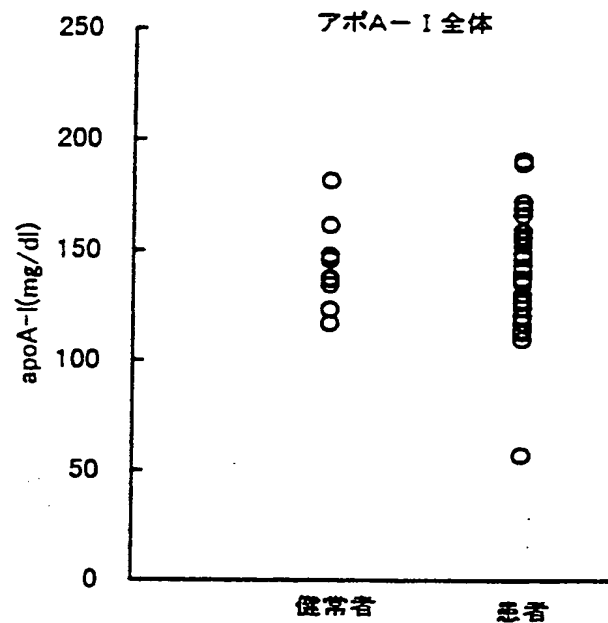
5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

 6


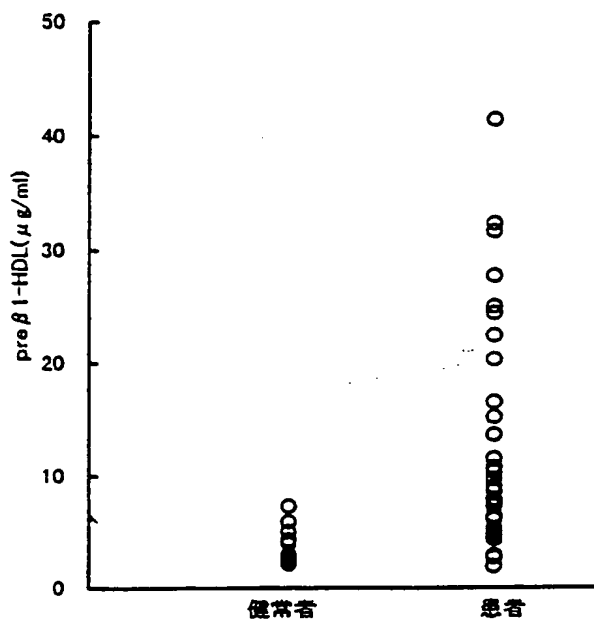
	健常者	患者
n	11	39
mean	18.9	38.6
SD	4.1	12.0



	健常者	患者
n	11	39
mean	144	142
SD	18	25

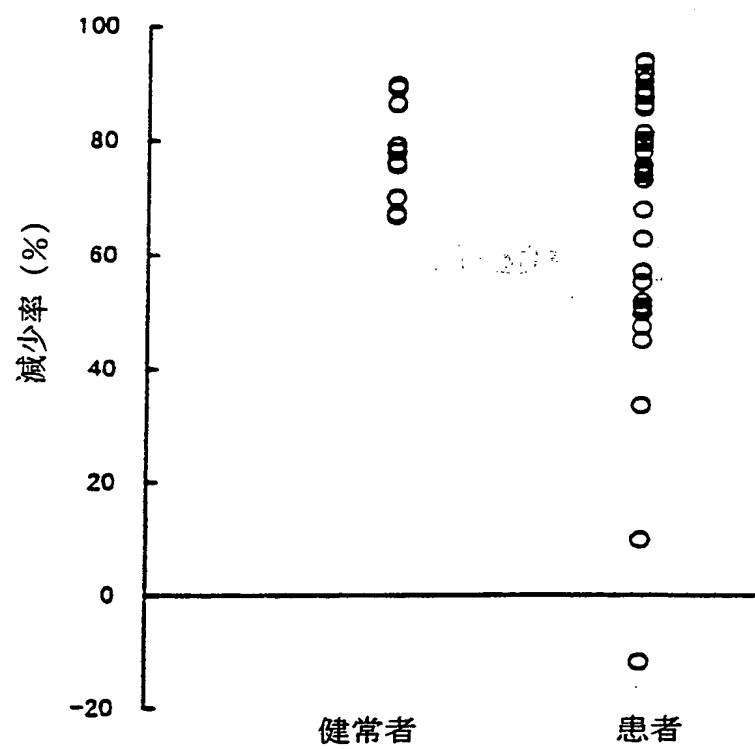
THIS PAGE BLANK (USPTO)

7



	健康者	患者
n	11	39
mean	3.8	12.2
SD	1.7	9.5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

 8


	健常者	患者
n	11	39
mean	79.1	68.5
SD	8.9	22.8

THIS PAGE BLANK (USPTO)